

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶
A61K 49/00

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98110637.4

[43]公开日 1999 年 8 月 4 日

[11]公开号 CN 1224622A

<p>[22]申请日 98.1.24 [21]申请号 98110637.4</p> <p>[71]申请人 张尚权</p> <p>地址 200011 上海市西凌家宅路 111 弄 4 号 1104 室</p> <p>共同申请人 陈小东</p> <p>[72]发明人 张尚权 陈小东</p>	<p>[74]专利代理机构 上海华东专利事务所</p> <p>代理人 费开途</p> <p>权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图页数 0 页</p>
---	--

[54]发明名称 肿瘤靶向造影剂

[57]摘要

本发明是一种肿瘤靶向造影剂,它是采用化学交联法将 CT 或 MRI 造影剂(泛影葡胺、欧乃派克、优维显、碘异肽醇或二乙三胺五乙酸钆葡甲胺)分别与亲肿瘤物质磺胺嘧啶、四环素或抗肿瘤膜蛋白单克隆抗体、生长因子受体类单克隆抗体连接,成为二元交联物,也可是 CT 或 MRI 造影剂通过人血清白蛋白与亲肿瘤物质化学交联成三元交联物。本发明造影剂具有在肿瘤组织部位聚焦的特性,能选择性增加肿瘤病灶的密度(CT 值和 MRI 信号强度),提高 CT 和 MRI 扫描在肿瘤诊断中的特异性和敏感性。

ISSN 1008-4274



方法 B 采用活化酯法, 所述 CT 或 MRI 增强扫描用的静脉造影剂中的羧基与 N-羟基琥珀酰亚胺在 DCC 作用下生成 N-羟基琥珀酰亚胺羧酸酯, 该酯与氨(或胺)作用生成二元交联物。

7.如权利要求2所述的肿瘤靶向造影剂三元交联物的制备方法,其特征在于首先在亲肿瘤物质上引入马来酰亚胺基或碘乙酰基,再在人血清白蛋白分子上引入巯基,二者引入的基团反应从而使亲肿瘤物质与人血清白蛋白交联,而人血清白蛋白分子中自由的氨基又可与CT或MRI增强扫描用的静脉造影剂中的羧基或其活化酯衍生物反应,从而得到三元交联物。

肿瘤靶向造影剂

本发明涉及影像学诊断用药物,尤其是关于一种肿瘤靶向造影剂,用于电子计算机断层摄影(CT)和磁共振成像(MRI)增强扫描对肿瘤的诊断。

造影剂是指在 X 线造影检查中,向体内特定部位引入某种高密度或低密度物质,从而产生密度上的差异,使有关结构或器官显影,这类物质称为造影剂。临床实践中,当对体内某一结构或器官内的异常病灶进行电子计算机断层摄影或磁共振成像扫描检查时,为了增加异常病灶的密度,提高 CT 和 MRI 扫描对病灶组织的分辨率,须从静脉内注射造影剂进行增强扫描,例如目前临床上 CT 增强扫描用泛影葡胺或欧乃派克, MRI 增强扫描用二乙三胺五乙酸钆葡甲胺。然而,由于这些常用的静脉造影剂缺乏与肿瘤组织的亲和性, CT 和 MRI 增强扫描虽能通过丰富的肿瘤血供增加肿瘤病灶的密度,但程度有限,而且对肿瘤病灶也缺乏特异性。因此, CT 和 MRI 扫描在肿瘤诊断方面仍缺乏非常可靠的参数指标。此外,籍亲肿瘤物质采用放射性核素显像诊断肿瘤,但具有同位素污染和显像分辨率较低的缺点,且大多数医院无这种特殊的显像设备。

为此,本发明目的是提供一种肿瘤靶向造影剂,它是具有肿瘤组织导向功能的静脉造影剂,用于 CT 和 MRI 增强扫描,提高 CT 和 MRI 扫描对肿瘤病灶的分辨率。

本发明是一种肿瘤靶向造影剂,它是由 CT 或 MRI 增强扫描用静脉造影剂与亲肿瘤物质通过化学交联法联接成二元交联物,或是由 CT 或 MRI 增强扫描用静脉造影剂、亲肿瘤物质与人血清白蛋白通过化学交联法联接成三元交联物,即为具有肿瘤导向特性的造影剂。该造影剂在静脉注射后相当短的时间内,能与肿瘤组织特异性结合,结果在 CT 和 MRI 扫描时显著提高肿瘤组织病灶内的密度,增强 CT 和 MRI 扫描对肿瘤诊断的特异性和敏感性。

本发明采用如下亲肿瘤物质:

1.磺胺嘧啶化合物

磺胺嘧啶在肿瘤组织病灶的选择性聚集现象在 50 年代由 Stevens 首先报道 (Stevens CD, Quinlin PM, Meinken MA, et al. Science 112:561;1950)。在 60 年代 Calvert 等进一步证实磺胺类药物的亲肿瘤特性 (Calvert N, Conors TA, Ross WCJ, et al. Eur J Cancer 4:627;1968)。由于磺胺分子量小, 在造影剂中溶解度高, 且对多种肿瘤组织有亲和性, 因此是制备肿瘤靶向造影剂的理想导向载体。

2.四环素化合物

本发明应用化学交联法在四环素上标记放射性核素 ^{111}In 用于荷人肺癌裸鼠模型的同位素显像, 2 小时后 γ 照相结果表明肿瘤部位呈现明显的放射性聚集, 证实了四环素也具有亲肿瘤特性。本发明还在多种肿瘤模型上进一步证实四环素的这一亲肿瘤特性。四环素对肿瘤组织的导向性聚集现象国内外至今尚无报道。

3.抗肿瘤膜蛋白或生长因子受体类单克隆抗体

国内外大量研究证实抗肿瘤膜蛋白单克隆抗体和生长因子受体类单克隆抗体可作为肿瘤导向治疗的载体, 例如抗肺癌、肝癌、乳腺癌、胶质瘤、卵巢癌、鳞状上皮癌等膜蛋白单克隆抗体和抗表皮生长因子受体、抗肿瘤生长因子受体单克隆抗体 (Mehren MV and Weiner LM, Current Opinion in Oncology 8:493-498, 1996)。迄今为止国内外已有多种类型的单克隆抗体 (包括鼠源性单抗) 批准上市或进入临床试验。尤其是肿瘤生长因子受体在多种肿瘤细胞高度表达, 其单克隆抗体可用于多种肿瘤的导向治疗。

CT 或 MRI 增强扫描用造影剂临床上有很多种, 本发明应用下列造影剂:

- (1) 泛影葡胺 (由泛影酸和葡甲胺混合而成, CT 增强扫描用)
- (2) 欧乃派克 (CT 增强扫描用)
- (3) 优维显 (CT 增强扫描用)

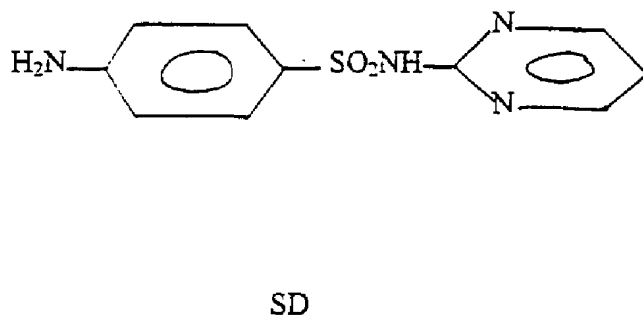
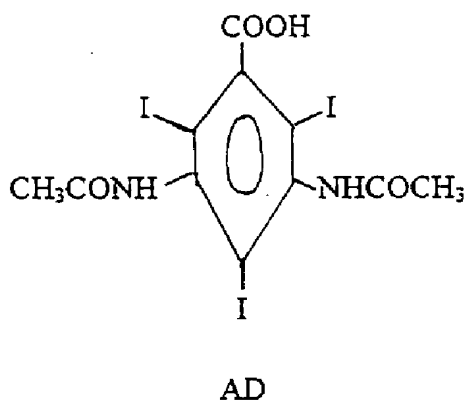
(4)碘异肽醇(CT 增强扫描用)

(5)二乙三胺五乙酸钆葡甲胺(MRI 增强扫描用)

本发明肿瘤靶向造影剂的制备方法

1.由 CT 或 MRI 增强扫描用静脉造影剂与亲肿瘤物质通过化学交联法联接而成静脉造影剂-亲肿瘤物质二元交联物。下面以泛影酸与磺胺嘧啶反应为例，制备泛影酸-磺胺嘧啶二元交联物。

基于泛影酸 (Acidum Diatrizoicum, AD, FW=649.95)和磺胺嘧啶 (Sulfadiazinum, SD, FW=250.28)的分子结构特点(其分子结构如下图所示),通过酰胺化反应制备。



方法 A: 参考文献 (Hurwitz E. et al, Cancer Res.,35 :1175,1975; Carrsson J. et al,

Biochem.J. 173:723, 1978) 采用二环己基碳二亚胺(DCC)脱水法

DCC (dicyclohexylcarbodiimide , FW=206)是一个良好的酰化缩合剂,DCC首先与羧基作用生成具有较大酰化能力的化合物,进而与氨基作用生成酰胺。本发明先将泛影酸与 DCC 溶于 DMF 或 DMSO 等溶剂中,室温下反应一定时间后,再将磺胺嘧啶加入,在 0-37 °C 间反应制得泛影酸-磺胺嘧啶二元交联物。

方法 B: 参考文献 (Smith M. J. et al, J Natl. Cancer Inst., 76:503, 1986; Kanello J. et al, J Natl. Cancer Inst.,75:319, 1985) 采用活化酯法

首先将羧酸与 N-羟基琥珀酰亚胺(简称 NHS,FW=113)在 DCC 作用下反应生成 N-羟基琥珀酰亚胺羧酸酯,该酯与胺(氨)的反应活性很高,能非常快与之反应生成相应的酰胺,而且反应条件很温和,产率亦很高。本发明先将泛影酸与 DCC 溶于 DMF 或 DMSO 等溶剂中,37 °C 下反应一定时间后,再将 NHS 的吡啶溶液加入,于 0-37 °C 下搅拌反应一定时间。所得活性酯衍生物溶液于-20 °C 贮存。将所得活性酯衍生物与胺(或氨)在 0-37 °C 下搅拌反应一定时间,所得产物通过色谱柱分离纯化,即得泛影酸-磺胺嘧啶二元交联物。

2.由 CT 或 MRI 增强扫描用的静脉造影剂、亲肿瘤物质与人血清白蛋白通过化学交联法联接成静脉造影剂-人血清白蛋白-亲肿瘤物质三元交联物。下面以泛影酸、磺胺嘧啶与人血清白蛋白为例制备泛影酸-人血清白蛋白(HSA)-磺胺嘧啶三元交联物。

泛影酸-人血清白蛋白-磺胺嘧啶三元交联物可使一分子 SD 通过中间体 HSA 接上许多 AD 分子(5-30AD/SD),从而提高造影剂在肿瘤部位的聚集量。基于 AD、SD 与 HSA(分子中含有许多氨基)的分子结构特点,首先在 SD 分子上引入马来酰亚胺基或碘乙酰基,再在 HSA 分子上引入巯基,HSA 分子的巯基与 SD 分子中引入的基团反应从而使 SD 与 HSA 交联,而 HSA 分子中自由的氨基又可与 AD 的羧基或其活化酯衍生物反应,从而制得目的产物。

制备方法

a. SD 分子上引入马来酰亚胺基或碘乙酰基, 参考文献 (Kitagawa T. et al , J Biochem, 83:1493, 1978; Carnett M. C. et al, J. Cancer, 31:661, 1983)

碘乙酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯(NSIA)是由碘乙酸与 N-羧基琥珀酰亚胺酯(NHS)反应制得的活化酯, 它与 SD 分子中的氨基反应而在 SD 分子上引入碘乙酰基;m-马来酰亚胺基苯甲酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯(MBA)或 4-(N-马来酰亚胺)丁酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯分别是由相应的酸与 NHS 反应制得的活化酯, 该酯与 SD 分子中的氨基反应而在 SD 分子上引入马来酰亚胺基。一般是以 DMF 为溶剂, 反应物中所用的酯与氨基的摩尔数相当, 反应条件比较温和, 室温下反应约 0.5-2h 即可, 反应产物用色谱柱分离纯化。

b. HSA 分子中引入 2-吡啶二硫基(DTP), 参考文献 (Kitagawa T., Fujitake T. And Aikawa T. J. Biochem, 83:1493, 1978)

3-(2-吡啶二硫基)丙酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (SPDP) 溶解于乙醇中, 然后将 5 倍过量的 SPDP 的乙醇溶液加入 HSA 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中, 室温下反应后, 通过 PD-10 柱脱盐终止反应。HSA 分子中的 2-吡啶二硫基(DTP)的摩尔数可用如下方法测定, 将产物用二硫苏糖醇(DTT)还原, 反应时间约 10min, DTT 的终浓度为 50mM, 测定 DTP 基团或 HSA 在 343 和 280nm 处的吸收峰, DTP 和 HSA 的摩尔消光系数分别为 8080 和 5100, 计算 HSA 分子中引入的 DTP 摩尔数。

c. AD 与 HSA 的交联, 参考文献 (Juc R., Lombert J.M. and Traut R.R. Biochem, 1:5399, 1978)

AD 的 NaOH 水溶液中加入 1-乙基-3(3-二甲基 氨基丙基) 碳二亚胺 (ECDI), 搅拌反应后, 加入 HSA-DTP 的 PBS 溶液, AD:ECDI:HSA 摩尔比为 70:100:1。室温下反应后, 通过色谱柱分离纯化得 AD-NH-HSA-SH。

d. 泛影酸-人血清白蛋白(HSA)-磺胺嘧啶三元交联物制备, 参考文献(Umemoto N, Kato Y and Takahashi T. J Appl Biochem, 6:297, 1984)



AD-HSA-DTP 用二硫苏糖醇(DTT)还原,DTT 的终浓度为 50mM,然后通过 G-25 柱脱盐,G-25 柱使用前经脱气,充氮气,用 pH=7.2 的磷酸盐缓冲液平衡.通过柱子流出的溶液直接与已引入马来酰亚胺基或碘乙酰基的 SD 分子反应,反应化合物经浓缩后,室温下搅拌反应过夜,粗产物用凝胶渗透色谱分离纯化,得 AD-HSA-SD 三元交联物。

3. 泛影酸-人血清白蛋白(HSA)-抗肿瘤或生长因子受体单克隆抗体交联物的制备步骤和方法类同于 AD-HSA-SD 的制备。
4. 二乙三胺五乙酸钆葡甲胺靶向造影剂和欧乃派克、优维显、碘异肽醇靶向造影剂的制备(包括二元和三元交联物)

二乙胺五乙酸钆葡甲胺靶向造影剂和欧乃派克、优维显、碘异肽醇靶向造影剂的制备步骤和方法基本上与上述泛影酸靶向造影剂相同。只是,碘异肽醇的四个伯羟基要预先保护,然后在适当时候脱去保护基团,伯羟基的保护方法可参考文献(Goerlach A,Kenia G and Geoffrey AP. Bioconjugate Chem,2:96,1991)。

肿瘤靶向造影剂临床前动物试验

1.肿瘤靶向造影剂在荷人肺癌裸鼠模型 CT 和 MRI 导向扫描实验结果显示,CT 增强扫描时,应用普通泛影葡胺造影剂的肿瘤病灶增加的 CT 值为用泛影葡胺-磺胺嘧啶交联物的 65 %。MRI 增强扫描时,肿瘤病灶信号强度的增加值为用普通造影剂二乙三胺五乙酸钆葡甲胺是靶向造影剂二乙三胺五乙酸钆葡甲胺-磺胺嘧啶交联物的 61 %。以上结果表明,肿瘤靶向造影剂比普通造影剂更能显著提高肿瘤病灶的 CT 值或 MRI 信号强度。

2.肿瘤靶向造影剂在兔子原位肝癌模型 CT 和 MRI 导向扫描实验结果显示,应用泛影葡胺增强扫描时肝癌病灶增加的 CT 值是使用肿瘤靶向 X 线造影剂泛影葡胺-磺胺嘧啶交联物时的 56 %,肿瘤靶向 X 线造影剂对肝癌病灶密度的提高显著大于普通造影剂泛影葡胺。MRI 肿瘤靶向磁造影剂二乙三胺五乙酸钆葡甲胺-磺胺嘧啶交联物对肝癌病灶密度的提高也显著大于普通磁造影剂二乙

三胺五乙酸钆葡甲胺,普通磁造影剂增加肿瘤病灶信号强度为肿瘤靶向磁造影剂的 68 %。

3.肿瘤靶向造影剂急性毒理试验

通过对 40 只昆明小白鼠毒理试验表明, 每只鼠尾静脉注射泛影葡胺-磺胺嘧啶交联物 0.5ml (共 20 只) 和注射二乙三胺五乙钆葡甲胺-磺胺嘧啶交联物 0.5ml (共 20 只), 观察一个月无小鼠死亡。

本发明肿瘤靶向造影剂的技术效果和优点

- 1.本发明肿瘤靶向造影剂在 CT 和 MRI 增强扫描时可选择性增加肿瘤病灶的密度 (CT 值和 MRI 信号强度), 而对良性病灶密度仅轻微上升或不升高, 从而提高 CT 和 MRI 扫描对肿瘤病灶诊断的分辨率和特异性。
- 2.本发明肿瘤靶向造影剂在 CT 和 MRI 增强扫描时可选择性增加纵隔和腹腔内癌性转移淋巴结的 CT 值或 MRI 信号强度, 而对炎症性淋巴结无明显影响。因此对鉴别纵隔和腹腔淋巴结是否存在肿瘤转移具有定性价值, 在评估肿瘤 TNM 分期中具有重大意义。
- 3.本发明肿瘤靶向造影剂比普通造影剂提高了 CT 和 MRI 扫描对肿瘤病灶诊断的分辨率和特异性, 也避免了肿瘤放射性核素显像诊断的同位素污染和显像分辨率较低的缺点。目前 CT 在绝大多数县级以上(包括县级)医院已经普及, MRI 也已在相当多的地、市级医院投入使用。因此, 本发明肿瘤靶向造影剂将使影像学技术在肿瘤诊断中具有定性意义, 从而提高 CT 和 MRI 扫描在肿瘤诊断中的价值, 是影像医学领域中的一大突破性进展。

本发明通过以下实施例作进一步阐述, 但并不限制本发明的范围。

实施例 1 DCC 脱水法制备泛影酸磺胺嘧啶二元交联物

称取 AD 粉末 650mg 和 DCC 206mg 溶于 DMF 中, 室温下搅拌约 3h, 加入 250mg SD, 继续搅拌反应约 10h。因为 AD 和 SD 均溶于氨水溶液中, 它们的反应产物亦溶于氨水溶液, 由于 DCC 不溶于氨水溶液, 可用氨水萃取除去 DCC,

从氨水溶液中得 AD-SD 二元交联物。

实施例 2 活化脂法制备泛影酸 - 磺胺嘧啶二元交联物

称取 AD 粉末 650mg 和 DCC 206mg 溶于 DMF 中, 室温下搅拌约 3h, 加入 115mg NHS, 于 4℃, 避光, 无水条件下, 继续搅拌反应约 10 小时。将活性酯反应物于氮气保护下于 -20℃ 贮存储备用。将所得活性酯与等摩尔数的 SD, 在 4℃ 下, 避光, 无水条件下, 继续搅拌反应约 4 小时。所得粗产物通过色谱柱分离纯化。即得 AD - SD 二元交联物。

实施例 3 肿瘤靶向造影剂在荷人肺癌裸鼠模型的 CT 和 MRI 导向扫描实验

以人肺癌细胞株 SPC A-1 接种裸鼠皮下(10^7 细胞/鼠), 制作荷人肺癌裸鼠模型。共 20 只, 分为 4 组(5 只/每组), 其中 2 组为观察组, 2 组为对照组。当肿瘤长至 1-1.5cm 大小进行所有裸鼠分别进行 CT(10 只)和 MRI(10 只)平扫, 测定肿瘤病灶 CT 值和 MRI 信号强度分别为 31Hu 和 281。观察组(各 5 只)裸鼠尾静脉注射 0.25ml 磺胺嘧啶-泛影葡胺交联物(含 150mg 泛影葡胺)或 0.25ml 磺胺嘧啶-二乙三胺五乙酸钆葡甲胺交联物, 对照组裸鼠(各 5 只)尾静脉注射 0.25ml 含相同量泛影葡胺或二乙三胺五乙酸钆葡甲胺。半小时后进行 CT 和 MRI 增强扫描, 测定肿瘤病灶 CT 值和 MRI 信号强度观察组分别为 68Hu 和 431, 对照组分别为 55Hu 和 372。

实施例 4 肿瘤靶向造影剂在兔子原位肝癌模型的 CT 和 MRI 导向扫描实验

以细胞株接种新西兰兔皮下(10^8 细胞), 成瘤后剥离皮下肿瘤切成 2mm^3 大小组织块, 用手术方式分别植入 16 只同种新西兰兔肝脏。1 个月后进行以下实验。将兔子分为 4 组(每组 4 只), 2 组行 CT 平扫, 2 组行 MRI 平扫, 测定肝脏肿瘤病灶 CT 值和 MRI 信号强度分别为 37Hu 和 170。CT 扫描 2 组兔子中 1 组从耳静脉注射肿瘤靶向 X 线造影剂磺胺嘧啶-泛影葡胺交联物 2ml(含 1.2g 泛影葡胺), 另一组注射 2ml 泛影葡胺; MRI 扫描 2 组兔子中 1 组从耳静脉注射 2ml 肿瘤靶向磁造影剂磺胺嘧啶-二乙三胺五乙酸钆葡甲胺交联物, 另一组注射 2ml

普通造影剂二乙三胺五乙酸钆葡甲胺。分别进行增强扫描，测定肝脏病灶 CT 值和 MRI 信号强度，在肿瘤靶向造影剂分别为 96Hu 和 821，普通造影剂分别为 70Hu 和 613。